

日本特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

25.03.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 3月25日

REC'D 16 MAY 2003

WIPO PCT

出願番号

Application Number:

特願2002-084414

[ST.10/C]:

[JP2002-084414]

出願人

Applicant(s):

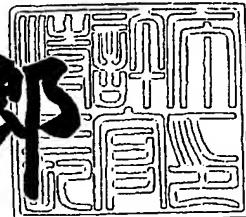
タカラバイオ株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月 2日

特許長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3031289

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願  
 【整理番号】 T-1740  
 【提出日】 平成14年 3月25日  
 【あて先】 特許庁長官 殿  
 【国際特許分類】 C12N 5/00  
                   C12N 5/08  
                   A61K 35/00

## 【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 賀酒造株式会社 中央研究所内

【氏名】 佐川 裕章

## 【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 賀酒造株式会社 中央研究所内

【氏名】 出野 美津子

## 【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 賀酒造株式会社 中央研究所内

【氏名】 加藤 郁之進

## 【特許出願人】

【識別番号】 591038141  
 【氏名又は名称】 賀酒造株式会社  
 【代表者】 大宮 久

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 063223  
 【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1  
 【物件名】 要約書 1

特2002-084414

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞傷害活性を有するT細胞の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 フィブロネクチン、そのフラグメント又はそれらの混合物から選択されるものを有効成分として使用することを特徴とする、細胞傷害活性を有するT細胞の製造方法。

【請求項2】 細胞傷害活性を有するT細胞がインターロイキン-2レセプターを高発現する細胞および/またはCD8陽性細胞を高比率で含有する細胞である請求項1記載の方法。

【請求項3】 調製の工程において、細胞の有する細胞傷害活性が高く維持されることを特徴とする請求項1または2記載の方法。

【請求項4】 固相に固定化されたフィブロネクチン、そのフラグメント又はそれらの混合物を使用する請求項1～3いずれか記載の方法。

【請求項5】 固相が細胞培養用器材である請求項4記載の方法。

【請求項6】 細胞培養用器材がシャーレ、フラスコ、バッグ、又はビーズである請求項5記載の方法。

【請求項7】 フィブロネクチン、そのフラグメント又はそれらの混合物を培地に添加する工程を包含する請求項1～3いずれか記載の方法。

【請求項8】 フィブロネクチンのフラグメントが細胞接着活性及び/又はヘパリン結合活性を有するポリペプチド、もしくは該ポリペプチドのアミノ酸配列に1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加を有するアミノ酸配列からなり、かつ細胞接着活性及び/又はヘパリン結合活性を有するポリペプチドを含有するフラグメントである請求項1～7いずれか記載の方法。

【請求項9】 細胞接着活性を有するポリペプチドが配列番号1(C-274)または2(CS-1)で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドである請求項8記載の方法。

【請求項10】 ヘパリン結合活性を有するポリペプチドが、配列番号3(H-271)で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドである請求項8記載の方法。

【請求項11】 フィブロネクチンのフラグメントが配列番号1～13でそれぞれ表わされるポリペプチドより選択されるポリペプチドである請求項8記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、医療分野において有用な、細胞傷害活性を有するT細胞を取得する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

生体は主として免疫応答により異物から守られており、免疫システムはさまざまな細胞とそれが作り出す可溶性の因子によって成り立っている。なかでも中心的な役割を果たしているのが白血球、特にリンパ球である。このリンパ球はBリ  
ンパ球（以下、B細胞と記載することがある）とTリンパ球（以下、T細胞と記  
載することがある）という2種類の主要なタイプに分けられ、いずれも抗原を特  
異的に認識し、これに作用して生体を防御する。

【0003】

T細胞は、CD (Cluster Designation) 4マーカーを有し、主に抗体産生の  
補助や種々の免疫応答の誘導に関与するヘルパーT細胞（以下、 $T_H$ と記載する  
）、CD8マーカーを有し、主に細胞傷害活性を示す細胞傷害性T細胞 [ $T_C$ ；  
細胞傷害性Tリンパ球 (cytotoxic T lymphocyte) ]、キラーT細胞とも呼ばれる  
。以下、CTLと記載がある]に亜分類される。腫瘍細胞やウイルス感  
染細胞等を認識して破壊、除去するのに最も重要な役割を果たしているCTLは  
、B細胞のように抗原に対して特異的に反応する抗体を產生するのではなく、標  
的細胞膜表面上に存在する主要組織適合複合体 [MHC : ヒトにおいてはヒト白  
血球抗原 (HLA) と称することもある] クラスI分子に会合した標的細胞由來  
の抗原 (抗原性ペプチド) を直接認識して作用する。この時、CTL膜表面のT  
細胞レセプター (以下、TCRと称す) が前述した抗原性ペプチド及びMHCク  
ラスI分子を特異的に認識して、抗原性ペプチドが自己由來のものなのか、ある

いは、非自己由来のものなのかを判断する。そして、非自己由来と判断された標的細胞はCTLによって特異的に破壊、除去される。

## 【0004】

近年、薬剤治療法や放射線治療法のように患者に重い肉体的負担がある治療法が見直され、患者の肉体的負担が軽い免疫治療法への関心が高まっている。特に免疫機能が正常なヒト由来のCTL又はT細胞から目的とする抗原に対して特異的に反応するCTLを生体外（イン・ビトロ、*in vitro*）で誘導した後、患者へ移入する養子免疫治療法の有効性が注目されている。例えば、動物モデルを用いた養子免疫療法がウイルス感染及び腫瘍に対して有効な治療法であることが示唆されている〔グリーンバーグ（Greenberg, P. D.）著、アドバンセズ・イン・イムノロジー（Advances in Immunology）、1992年発行；ロイゼル P. ら（Reusser P., et al.）、ブラッド（Blood）、第78巻、第5号、第1373～1380頁（1991）〕。この治療法ではCTLの抗原特異的傷害活性を維持もしくは増強させた状態でその細胞数を維持あるいは増加させることが重要である。

## 【0005】

上記の養子免疫療法において、治療効果を得るために一定量以上の細胞数のCTLを投与する必要がある。すなわち、イン・ビトロでこれらの細胞数を短時間に得ることが最大の問題であるといえる。

## 【0006】

CTLの抗原特異的傷害活性を維持及び増強するためには、CTLについて抗原に特異的な応答を誘導する際に、目的とする抗原を用いた刺激を繰り返す方法が一般的である。しかし、通常、この方法では最終的に得られるCTL数が減少し、十分な細胞数が得られない。

## 【0007】

疾病の治療に有効なT細胞を調製する方法としては、例えば、高濃度のIL-2を用いて誘導した腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を用いる養子免疫療法〔ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン（N. Engl. J. Med.）、第316巻、第1310～1321頁（1986）；ローゼンバーグ S. A. ら（Rosenberg S. A., et al.）、N. Engl. J. Med.、第319巻、第25号、第1676～1680頁（1988）；ホ

M. ら (Ho M., et al.) 、 Blood、第81巻、第8号、第2093～2101頁 (1993) ]  
が知られている。

## 【0008】

次に、抗原特異的なCTLの調製に関しては、自己CMV感染纖維芽細胞とIL-2 [リデル S. A. ら (Riddell S. A., et al.) 、ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.) 、第146巻、第8号、第2795～2804頁 (1991) ]、あるいは抗CD3モノクローナル抗体 (抗CD3 mAb) とIL-2 [リデル S. A. ら (Riddell S. A., et al.) 、ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (J. Immunol. Methods) 、第128巻、第2号、第189～201頁 (1990) ]を用いて、それぞれCMV特異的CTLクローンを単離ならびに大量培養する方法が報告されている。

## 【0009】

さらに、国際公開第96/06929号パンフレットにはREM法 (rapid expansion method) が開示されている。このREM法は、抗原特異的CTL及びTHを含むT細胞の初期集団を短期間で増殖 (Expand) させる方法である。つまり、個々のT細胞クローンを増殖させて大量のT細胞を提供可能であり、抗CD3抗体、IL-2、並びに放射線照射により増殖性をなくしたPBMC (peripheral blood mononuclear cell、末梢血单核細胞) とエプスタイン-バールウイルス (Epstein-Barr virus、以下EBVと略す) 感染細胞とを用いて抗原特異的CTL数を増殖させることが特徴である。

## 【0010】

上記のとおり、細胞傷害活性を有するT細胞、例えばCTL、TIL等を取得する工程においてはインターロイキン-2の利用を欠かすことができない。細胞表面のインターロイキン-2レセプターにインターロイキン-2が結合することにより、細胞はさらに活性化される。この点においても細胞表面のインターロイキン-2レセプターの発現を上昇させることは重要である。また、CTLの誘導においては、抗原による刺激に供されたCTLの前駆細胞がCTLとして誘導される効率を向上させること、すなわち、誘導後の細胞群におけるCD8陽性細胞の割合を向上させることが重要である。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、医療への使用に適した、細胞傷害活性を高いレベルで保持したT細胞を取得する方法を提供することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明は、細胞傷害活性を有するT細胞の製造方法であって、フィブロネクチン、そのフラグメント又はそれらの混合物から選択されるものを有効成分として使用することを特徴とする。

【0013】

本発明において得られる細胞傷害活性を有するT細胞としては、インターロイキン-2 レセプターを高発現する細胞および／またはCD8陽性細胞を高比率で含有する細胞が挙げられる。また、当該方法の工程において、細胞の有する細胞傷害活性は高く維持されることができる。

【0014】

本発明において、前記フィブロネクチン、そのフラグメント又はそれらの混合物は固相、例えば細胞培養用器材に固定化して使用すること、もしくは培地に添加して使用することができる。

【0015】

本発明に使用されるフィブロネクチンのフラグメントとしては細胞接着活性及び／又はヘパリン結合活性を有するポリペプチド、もしくは該ポリペプチドのアミノ酸配列に1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加を有するアミノ酸配列からなり、かつ細胞接着活性及び／又はヘパリン結合活性を有するポリペプチドを含有するフラグメントが例示される。

【0016】

さらに、本発明の別の態様としては、前記フィブロネクチン、そのフラグメント又はそれらの混合物を有効成分として含有する細胞傷害活性活性化剤、ならびに本発明の製造方法により製造された細胞傷害活性を有するT細胞を有効成分として含有することを特徴とする治療剤が挙げられる。

## 【0017】

## 【発明の実施の形態】

本発明は、フィブロネクチンのフラグメントの存在下に調製された細胞傷害活性を有するT細胞において、インターロイキン-2レセプター（以下、IL-2Rと略す）の発現量の有意な上昇が認められることを見出し、完成するに至ったものである。

## 【0018】

なお、本願明細書において細胞傷害活性を有するT細胞の調製とは、当該細胞の誘導（活性化）、維持、拡大培養の各工程、もしくはこれらを組み合わせた工程を包含する工程を指す。

## 【0019】

以下、本発明を具体的に説明する。

## (1) 本発明に使用されるフィブロネクチン、およびそのフラグメント

本明細書中に記載のフィブロネクチンおよびそのフラグメントは、天然から得られたもの、または人為的に合成されたもののいずれでもよい。フィブロネクチンおよびそのフラグメントは、例えば、ルオスラーティ E. ら [Ruoslahti E., et al., ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)、第256巻、第14号、第7277～7281頁 (1981) ] の開示に基づき、天然起源の物質から実質的に純粋な形態で製造することができる。ここで、本明細書に記載された実質的に純粋なフィブロネクチンまたはフィブロネクチンフラグメントとは、これらが天然においてフィブロネクチンと一緒に存在する他のタンパク質を本質的に含有していないことを意味する。上記のフィブロネクチン、およびそのフラグメントは、それぞれ単独で、もしくは複数の種類のものを混合して本発明に使用することができる。

## 【0020】

本発明に使用できるフィブロネクチンフラグメント、ならびに該フラグメントの調製に関する有用な情報は、キミヅカ F. ら [Kimiduka F., et al., ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.)、第110巻、第284～291頁 (1991) ]、コーンブリット A. R. ら [Kornbrihtt A. R., et al., EMBO

ジャーナル (EMBO J.)、第4巻、第7号、1755～1759 (1985) ]、およびセキグチ K. ら [Sekiguchi K., et al.、バイオケミストリー (Biochemistry)、第25巻、第17号、4936～4941 (1986) ] 等より得ることができる。

## 【0021】

本発明においては、特に限定するものではないが、フィブロネクチン由来の細胞結合ドメイン [インテグリン $\alpha 5\beta 1$  (VLA-5) 結合ドメイン、インテグリン $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4) 結合ドメイン] および／またはヘパリン結合ドメインを有するフラグメントが好適に使用される。VLA-5 結合ドメインを有するフラグメントとしては配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するフラグメントが、VLA-4 結合ドメインを有するフラグメントとしては配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するフラグメントが、さらにヘパリン結合ドメインを有するフラグメントとしては配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するフラグメントがそれぞれ例示される。

## 【0022】

なお、本発明に使用されるフラグメントは、上記の結合活性を有している範囲において、フィブロネクチン由来のアミノ酸配列に1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加を有していてもよい。例えば、2つの異なるドメイン間にリンカーとして1以上のアミノ酸が挿入されたフラグメントも本発明に使用することができる。

## 【0023】

本明細書中に記載の実質的に純粹なフィブロネクチンフラグメントは、例えば、米国特許第5,198,423号の記載に基づいて遺伝子組換え体より製造することもできる。特に、下記実施例でH-271 (配列番号3)、H-296 (配列番号4)、CH-271 (配列番号5) およびCH-296 (配列番号6) として記載されている組換えフラグメントならびにこれらを取得する方法はこの特許に詳細に記載されている。また、下記実施例で使用したC-274 (配列番号1) フラグメントは米国特許第5,102,988号に記載された方法により得ることができる。さらに、C-CS1 フラグメント (配列番号7) は日本特許第3104178号に記載された方法により得ることができる。

## 【0024】

上記の、CH-271、CH-296、C-274、C-CS1の各フラグメントはVLA-5に結合する活性を有する細胞結合ドメインを有するポリペプチドである。また、C-CS1、H-296はVLA-4に結合する活性を有する細胞結合ドメインを有するポリペプチドである。さらに、H-271、H-296CH-271およびCH-296はヘパリン結合ドメインを有するポリペプチドである。

## 【0025】

上記の各ドメインが改変されたフラグメントも本発明に使用することができる。フィブロネクチンのヘパリン結合部位は3つのIII型類似配列（III-12、II-13、III-14）によって構成されている。前記III型類似配列のうちの一つもしくは二つを欠失したヘパリン結合部位を含むフラグメントも本発明に使用することが可能である。例えば、フィブロネクチンの細胞結合部位（VLA-5結合ドメイン、Pro1239～Ser1515）と一つのIII型類似配列とが結合したフラグメントであるCHV-89（配列番号8）、CHV-90（配列番号9）、CHV-92（配列番号10）、あるいは二つのIII型類似配列とが結合したフラグメントであるCHV-179（配列番号11）、CHV-181（配列番号12）が例示される。CHV-89、CHV-90、CHV-92はそれぞれIII-13、III-14、III-12を含むものであり、CHV-179はIII-13とIII-14を、CHV-181はIII-12とIII-13をそれぞれ含んでいる。CHV-89、CHV-90、CHV-179は、日本特許第2729712号に記載された方法により得ることができる。また、CHV-181は国際公開第97/18318号パンフレットに記載された方法により得ることができる。さらに、CHV-92は上記文献に記載されたプラスミドに基づいて定型的にプラスミドを構築し、該プラスミドを用いて遺伝子工学的に取得することができる。

## 【0026】

また、下記実施例に使用されたH-275-Cys（配列番号13）は、フィブロネクチンのヘパリン結合ドメインを有し、かつC末端にシステイン残基を有するフラグメントである。当該フラグメントも本発明に使用することができる。

## 【0027】

これらのフラグメントまたはこれらフラグメントから定型的に誘導できるフラグメントは、日本国〒305-8566茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センターに下記受託番号のもとで寄託された微生物を用いて製造する、あるいは各微生物の保持するプラスミドを公知方法により改変することにより製造することができる；

FERM BP-2799 (H-271をコードするプラスミドを保有する大腸菌)、  
 FERM BP-2800 (CH-296をコードするプラスミドを保有する大腸菌)、  
 FERM BP-2799 (CH-271をコードするプラスミドを保有する大腸菌)、  
 FERM P-10721 (H-296をコードするプラスミドを保有する大腸菌)、  
 FERM BP-5723 (C-CS1をコードするプラスミドを保有する大腸菌)、  
 FERM P-12182 (CHV-89をコードするプラスミドを保有する大腸菌)、  
 FERM P-12183 (CHV-179をコードするプラスミドを保有する大腸菌)。

## 【0028】

本発明で使用されるフラグメントの細胞結合ドメインと細胞との結合は慣用の方法を使用してアッセイすることができる。例えば、このような方法には、ウイリアムズ D. A. らの方法 [Williams D. A., et al., ネイチャー (Nature)、第352巻、第438~441頁 (1991) ] が含まれる。当該方法は、培養プレートに固定化したフラグメントに対する細胞の結合を測定する方法である。

## 【0029】

また、上記方法において、細胞に換えてヘパリン、例えば標識ヘパリンを使用することにより、同様の方法でフラグメントのヘパリン結合ドメインの評価を行うことができる。

## 【0030】

## (2) 本発明の細胞傷害活性を有するT細胞の活性化方法

本願明細書において細胞傷害活性を有するT細胞とは細胞傷害活性を有するT細胞を含有する細胞群を意味する。なお、狭義には前記細胞群に含有されている細胞傷害活性を有するT細胞のみを指すことがある。

## 【0031】

本発明の細胞傷害活性を有するT細胞としては、本発明を特に限定するものではないが、例えば抗原特異的な細胞傷害活性を有する細胞傷害性T細胞（C T L）、腫瘍浸潤リンパ球（T I L）等が挙げられる。

## 【0032】

本発明の細胞傷害活性を有するT細胞の活性化方法は、フィブロネクチン、そのフラグメント又はそれらの混合物から選択される有効成分の存在下に前記細胞を活性化することを1つの大きな特徴とする。

## 【0033】

以下、抗原特異的な細胞傷害活性を有する細胞傷害性T細胞（C T L）を例に説明する。

C T Lの誘導は、前記有効成分の存在下、C T Lに所望の抗原に対する認識能力を付与するために、適切な抗原提示細胞とともにC T Lへの分化能を有する前駆細胞をインキュベートすることにより実施される。前駆細胞はC T Lになる前段階で、しかもC T Lに分化するように運命付けられている細胞であれば特に限定されるものではなく、例えば末梢血単核球（P B M C）、ナイーブ細胞、メモリー細胞等が挙げられる。抗原提示細胞は、T細胞に対して認識すべき抗原を提示する能力を有する細胞であれば特に限定はない。例えば、単球、B細胞、T細胞、マクロファージ、樹状細胞、線維芽細胞等に所望の抗原を提示させ、本発明に使用することができる。

## 【0034】

抗原提示細胞は、抗原提示能を有する細胞に抗原ペプチドを付加し、その表面に抗原ペプチドを提示させることにより調製することができる〔例えば、ベンドナレク M. A. ら（Bendnarek M. A., et al.）、J. Immunol.、第147巻、第12号、第4047～4053頁（1991）を参照〕。また、抗原提示能を有する細胞が抗原を処理（process）する能力を有している場合には、当該細胞に抗原を付加することにより、抗原が細胞内に取り込まれてプロセッシングを受け、断片化された抗原ペプチドが細胞表面に提示される。なお、抗原ペプチドを抗原提示能を有する細胞に付加する場合、使用される抗原提示細胞、誘導しようとするC T LのH L A拘束性に合致する抗原ペプチドが使用される。

なお、本発明において使用される抗原は特に限定されるものではなく、例えば細菌、ウィルスなどの外来性抗原や腫瘍関連抗原（癌抗原）などの内存性抗原等が挙げられる。

## 【0035】

本発明においては、抗原提示細胞は非増殖性とすることが好ましい。細胞を非増殖性とするためには、例えばX線等の放射線照射又はマイトマイシン（mitomycin）等の薬剤による処理を行えばよい。

## 【0036】

本発明のCTLの誘導方法において使用される培地には特に限定はなく、CTL、その前駆細胞、ならびに抗原提示細胞の維持、生育に必要な成分を混合して作製された公知の培地を使用することができ、たとえば市販の培地であってもよい。これらの培地はその本来の構成成分以外に適当なタンパク質、サイトカイン類、その他の成分を含んでいてもよい。好適には、インターロイキン-2（IL-2）を含有する培地が本発明に使用される。

## 【0037】

さらに、PCT/JP01/07032号明細書に記載された、抗原特異的な細胞傷害活性を有する細胞傷害性T細胞の誘導に有効な酸性多糖、酸性オリゴ糖、酸性单糖及びそれらの塩からなる群より選択される化合物や、下記（A）～（D）から選択される物質が共存していてもよい。

- (A) CD44に結合活性を有する物質
- (B) CD44リガンドがCD44に結合することにより発せられるシグナルを制御し得る物質
- (C) 成長因子の成長因子レセプターへの結合を阻害し得る物質
- (D) 成長因子が成長因子レセプターに結合することにより発せられるシグナルを制御し得る物質

## 【0038】

前記CD44に結合活性を有する物質としては、例えばCD44リガンド及び／又は抗CD44抗体が例示される。CD44リガンドがCD44に結合することにより発せられるシグナルを制御し得る物質としては、例えば各種リン酸化酵

素の阻害剤が挙げられる。成長因子の成長因子レセプターへの結合を阻害し得る物質としては、例えば成長因子に結合活性を有し、成長因子と複合体を形成することにより成長因子が成長因子レセプターに結合するのを阻害する物質、もしくは成長因子レセプターに結合活性を有し、成長因子が成長因子レセプターに結合するのを阻害する物質が挙げられる。さらに、成長因子が成長因子レセプターに結合することにより発せられるシグナルを制御し得る物質としては、例えば各種リン酸化酵素の阻害剤が挙げられる。

上記の各種物質は単独で、もしくは2種以上混合して用いることができる。

#### 【0039】

本発明における、フィブロネクチン、そのフラグメント又はそれらの混合物から選択される有効成分の存在下、CTLへの分化能を有する前駆細胞を抗原提示細胞とともにインキュベート（共培養）してCTLを誘導するため的一般的な条件は、公知の条件〔例えば、ベンドナレク M. A. ら (Bendnarek M. A., et al.)、J. Immunol.、第147巻、第12号、第4047～4053頁 (1991)を参照〕に従えばよい。共培養条件には特に限定ではなく、通常の細胞培養に使用される条件を使用することができ、例えば、37℃、5%CO<sub>2</sub>等の条件で培養することができる。この共培養は通常、2～15日程度実施されるが、その間に抗原提示細胞を新たに調製したものに取り替えて再刺激を行ってもよい。また、適当な時間間隔で培地を新鮮なものに交換することができる。

#### 【0040】

共培養を行う培地中における、本発明の有効成分の含有量は所望の効果が得られれば特に限定するものではないが、例えば0.01～1000μg/ml、より好ましくは0.1～100μg/mlである。なお、有効成分は培地中に溶解して共存させる他、適切な固相、例えばシャーレ、フラスコ、バッグ、ビーズ等の細胞培養用器材に固定化して使用してもよい。誘導されたCTLを生体に投与する観点からは、前記有効成分を固定化して使用することが望ましい。

フィブロネクチンのフラグメントの固定化は、国際公開第97/18318号パンフレット、ならびに国際公開第00/09168号パンフレットに記載の方法により実施することができる。

## 【0041】

こうして誘導されたCTLについてインターフェロン-2レセプター(IL-2R)の発現量を測定すると、フィブロネクチン、そのフラグメント又はそれらの混合物の非存在下に誘導されたCTLに比較して有意なIL-2R発現量の増加が認められる。ここで、IL-2R発現量は公知の方法、例えば、IL-2R抗体を使用して測定することができる。

## 【0042】

上記のように、本発明の方法により誘導されたCTLはIL-2Rの発現量が増加しており、培地中に添加された、あるいはCTLの前駆細胞、CTL自体もしくは共存するその他の細胞が合成したインターロイキン-2による刺激に対する感受性が向上している。このため、本発明の方法による誘導操作が行われている細胞群はインターロイキン-2の有するT細胞活性化作用により敏感に反応する。この結果、最終的に回収されるCTLは高い細胞傷害活性を保持している。

## 【0043】

さらに、上記のCTL誘導操作を行って得られる細胞群では、フィブロネクチン、そのフラグメント又はそれらの混合物の非存在下に誘導が行われた場合に比べてCD8マーカーを有する(CD8陽性)細胞、すなわちCTLもしくはCTLの前駆細胞の存在比率が高い。このことも、本発明の方法がCTLの調製において極めて有用であることを示している。

## 【0044】

本発明のCTL誘導操作を行って得られる細胞群におけるCD8陽性細胞の比率は、特に限定するものではないが、例えば抗CD8抗体を使用して測定することができる。

## 【0045】

さらに、本発明の方法により誘導されたCTLは所望の抗原を特異的に認識する能力を有しており、例えば該抗原を有する細胞を、その細胞傷害活性により特異的に破壊する。このCTLの細胞傷害活性は公知の方法により評価できる。例えば、抗原提示細胞により提示されたペプチドと放射性物質、蛍光物質等で標識した標的細胞に対する傷害性、放射能の取り込みによって測定できるCTL増殖の

抗原特異的な増加若しくはC T Lや標的細胞より抗原特異的に遊離されるGM-CSF、IFN- $\gamma$ 等のサイトカイン量を測定することにより検出することができる。その他蛍光色素等によって標識された抗原ペプチドや複合体の使用によって直接確認することもできる。この場合、例えばC T LをC T L特異性抗体とカップリングさせた第1蛍光マーカーと接触させてた後に第2蛍光マーカーとカップリングさせた抗原ペプチド-MHC複合体を接触させ、そして二重標識細胞の存在をF A C S (fluorescence-activated cell sorting) 分析によって行うことができる。

## 【0046】

本発明の方法により誘導されたC T Lは誘導後の細胞を長期間にわたって維持、あるいはこれを増強させても、従来観察されたような抗原特異的な細胞傷害活性の著しい低下がないという優れた性質を有している。従って、誘導されたC T Lをクローン化することにより、安定した細胞傷害活性を有するリンパ球として維持することもできる。例えば、誘導されたC T Lに抗原、各種サイトカイン、抗CD3抗体刺激を与えることにより増殖させ、拡大培養することができる。このC T Lの維持、拡大培養には、特に限定はなく、公知の方法を用いることができる。

## 【0047】

本発明の細胞傷害性T細胞の維持方法は、C T Lを抗原特異的な細胞傷害活性を保ったままで維持する方法である。該方法は本発明の有効成分、すなわちフィブロネクチン、そのフラグメント又はそれらの混合物を含有する培地中でC T Lを継続培養、拡大培養することを1つの大きな特徴としており、該細胞の有する抗原特異的な細胞傷害活性を維持させた状態でその細胞数を増加させることができる。

## 【0048】

上記方法を適用可能なC T Lには限定はなく、公知の方法で得られたC T Lをその抗原特異的な細胞傷害活性を維持させたまま、本発明の方法で維持および／または拡大することができる。また、上記の本発明の細胞傷害性T細胞の誘導方法によって得られたC T Lの維持にも好適に使用される。

## 【0049】

継続および／または拡大培養を行う培地中における、本発明の有効成分の含有量は所望の効果が得られれば特に限定されるものではないが、例えば0.01～1000μg/ml、より好ましくは0.1～100μg/mlである。なお、有効成分は、上記の本発明のCTL誘導方法と同様に、培地中に溶解して共存させる他、適切な固相に固定化して使用してもよい。さらに、上記のようなCTLの誘導に有効な物質を添加してもよい。

## 【0050】

本発明においては、CTLの継続培養の一般的な条件は公知の条件〔例えば、カーター J. ら (Carter J., et al.)、イムノロジー (Immunology)、第57巻、第1号、第123～129頁 (1986) を参照〕に従えばよい。本発明の細胞傷害性T細胞の維持方法に使用される培地にも特に限定はなく、たとえば上記のCTLの誘導方法に使用される培地を使用することができる。

## 【0051】

本発明において、細胞傷害性T細胞の拡大培養する場合には、前記有効成分に加え、抗CD3抗体、好ましくは抗CD3モノクローナル抗体をさらに含有する培地中でCTLを共培養するのが望ましい。また、さらに好適には、CTLは適切なフィーダ細胞と共に培養される。

## 【0052】

上記方法に使用される培地には特に限定はなく、CTLの培養、生育に必要な成分を混合して作製された公知の培地を使用することができ、たとえば市販の培地であってもよい。なお、CTLをフィーダ細胞と共に培養する場合には、CTL、フィーダ細胞の両者の維持、生育に適した培地であることが望ましい。これらの培地はその本来の構成成分以外に適当なタンパク質、サイトカイン類、その他の公知の成分を含んでいてもよく、例えば、IL-2を含有する培地が本発明に好適に使用される。抗CD3抗体、特に抗CD3モノクローナル抗体はCTL上のT細胞レセプターを活性化する目的で添加することができる。なお、抗CD3抗体の培地中における含有量は公知の条件に従って決定すればよく、例えば0.01～1μg/mlが好適である。

## 【0053】

本発明の方法に使用されるフィーダ細胞は、抗CD3モノクローナル抗体と協同してCTLを刺激し、T細胞レセプターを活性化するものであれば特に限定はない。本発明には、例えば、PBMCやEBV-B細胞が使用される。通常、フィーダ細胞は放射線照射のような手段で増殖能を奪ったうえで使用される。なお、フィーダ細胞の培地中における含有量は公知の方法に従って決定すればよく、例えば、 $1 \times 10^5 \sim 7$  cells/mlが好適である。

## 【0054】

特に好ましい態様においては、フィーダ細胞として、非ウィルス感染細胞、例えば、EBV-B細胞以外のものが使用される。これにより、拡大培養されたCTL中にEBVが混在する可能性を排除することができ、養子免疫療法のようなCTLを利用した医療の安全性を高めることが可能となる。

## 【0055】

本発明のCTLの拡大培養方法において、その培養条件には特に限定はなく、通常の細胞培養に使用される条件を使用することができ、例えば、37℃、5% CO<sub>2</sub>等の条件で培養することができる。また、適当な時間間隔で培地を新鮮なものに交換することができる。

## 【0056】

なお、本発明のCTLの拡大培養方法については、前記有効成分を使用されている培地に添加していれば特に限定は無く、上記以外の従来のCTL拡大培養法において、本発明の有効成分を培地に添加する態様も本発明に包含される。

## 【0057】

本発明の拡大培養方法によれば、例えば14日間の拡大培養によって100～1000倍に細胞数の増加したCTLを得ることができる。さらに、こうして得られたCTLは従来のCTL拡大培養法、例えばREM法で得られたものに比べてより高い抗原特異的な細胞傷害活性を保持している。

## 【0058】

このような本発明の効果は、本発明の方法で拡大培養されたCTLの有する細胞傷害活性を前記の方法により測定し、確認することができる。

## 【0059】

上記のCTLの誘導、維持、拡大培養と同様に、フィブロネクチン、そのフラグメント又はそれらの混合物の存在下に培養することにより、TILについても高い細胞傷害活性を有する細胞群を調製することができる。本発明においては、これらの細胞の活性化操作においてフィブロネクチン、そのフラグメント又はそれらの混合物を共存させる他には特に限定ではなく、前記細胞の培養、活性化に適した培地を使用して実施することができる。フィブロネクチン、そのフラグメント又はそれらの混合物の使用量、添加方法等についてはCTLにおける使用方法に準じて適切なものを選択すればよい。

## 【0060】

また、前記の有効成分、すなわちフィブロネクチン、そのフラグメント又はそれらの混合物は、T細胞の細胞傷害活性を維持または増強するための細胞傷害活性活性化剤として使用することができる。前記活性化剤は、有効成分そのもの、またはさらにその他の任意の成分、たとえば、活性化しようとする細胞に適した培地、タンパク質、サイトカイン類（好適にはIL-2）、所望のその他の成分とからなる。また、前記活性化剤を含有する培地は細胞傷害活性活性化用培地として使用することができる。前記培地は細胞培養のための基本的な成分を任意に含むものである。なお、前記活性化剤および活性化用培地は公知の方法により製造することができる。

## 【0061】

さらに、上記の活性化剤はその成分が適切な固相、例えばシャーレ、フラスコ、バッグ、ピーズ等の細胞培養用器材に固定化された形態であってもよい。

## 【0062】

上記の細胞傷害活性を有するT細胞の活性化方法を用いて得られたT細胞含有培養物中には、通常、ヘルパーT細胞等のCTL以外の細胞も混在している。本発明においては、該培養物から遠心分離等により該培養物中の細胞を回収し、本発明の方法により得られた細胞傷害活性を有するT細胞としてそのまま使用することができる。

## 【0063】

また、さらに該培養物から公知の方法により、細胞傷害活性を有するT細胞を高含有する細胞集団（あるいは培養物）を分離し、本発明の方法により得られたT細胞として使用することもできる。すなわち、本発明の細胞傷害活性を有するT細胞の活性化方法は、当該方法により得られた培養物から細胞傷害活性を有するT細胞を高含有する細胞集団を選択する工程を含むことができる。

## 【0064】

細胞傷害活性を有するT細胞を高含有する該細胞集団の選択方法については特に限定はないが、例えば培養物から所望の細胞表面上に発現している細胞表面抗原に対する抗体、例えばCTLの場合には抗CD8抗体、を結合させた担体を用いて目的の細胞のみを選択的に回収する方法や、フローサイトメーターを用いる方法が挙げられる。前記担体としては磁気ビーズやカラムが例示される。また、培養物から所望の細胞以外の細胞を吸着除去することにより、目的の細胞を高含有する細胞集団を得ることもできる。例えば、ヘルパーT細胞表面上に発現している細胞表面抗原に対する抗体、例えば抗CD4抗体を使用し、CTL含有培養物からヘルパーT細胞を除去することができる。この工程にはフローサイトメーターを用いることもできる。このようにして得られた細胞傷害活性を有するT細胞を高含有する細胞集団は、培養物から非選択的に回収された細胞集団と比較してより強い細胞傷害活性を有しており、特に医療分野において好適に使用できる。

## 【0065】

さらに本発明は、上記の本発明の細胞傷害活性を有するT細胞の活性化方法で得られた、細胞傷害活性を有するT細胞を提供する。かかるT細胞は、高い細胞傷害活性を有しており、長期間にわたる継続培養や拡大培養を行っても細胞傷害活性の低下が少ないという性質を有する。また、本発明は、当該T細胞を有効成分として含有する治療剤を提供する。特に、CTLを含有する前記治療剤は養子免疫療法への使用に適している。養子免疫療法においては、患者の治療に適した抗原特異的な細胞傷害活性を有するCTLが、例えば静脈への投与によって患者に投与される。当該治療剤は製薬分野で公知の方法に従い、例えば、本発明の方法により調整されたCTLを有効成分として、たとえば、公知の非経口投与に適

した有機または無機の担体、賦形剤、安定剤等と混合することにより調製できる。なお、治療剤におけるCTLの含有量、治療剤の投与量、当該治療剤に関する諸条件は公知の養子免疫療法に従って適宜、決定できる。

## 【0066】

## 【実施例】

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの記載に何ら限定されるものではない。なお、実施例における%は特段の事情がない限り重量%を意味する。

## 【0067】

## 実施例1 フィブロネクチンフラグメントの調製

## (1) フィブロネクチンフラグメントの調製

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント H-271は、Escherichia coli HB101/pHD101 (FERM BP-2264) より、米国特許第5,198,423号公報に記載の方法により調製した。

また、ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント H-296、CH-271、CH-296はそれぞれ、Escherichia coli HB101/pHD102 (FERM P-10721)、Escherichia coli HB101/pCH101 (FERM BP-2799)、Escherichia coli HB101/pCH102 (FERM BP-2800) を用い、これを上記の公報に記載の方法で培養し、該培養物より調製した。

## 【0068】

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント C-274は、Escherichia coli JM109/pTF7221 (FERM BP-1915) を用い、これを米国特許第5,102,988号公報に記載の方法で培養し、該培養物より調製した。

## 【0069】

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント C-CS1は、Escherichia coli HB101/pCS25 (FERM BP-5723) を用い、日本特許3104178号公報に記載の方法で培養し、該培養物より調製した。

## 【0070】

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント CHV-89、CHV-179は

、それぞれEscherichia coli HB101/pCHV89 (FERM P-12182) 、Escherichia coli HB101/pCHV179 (FERM P-12183) を用い、日本特許2729712号公報に記載の方法で培養し、該培養物より調製した。

【0071】

また、ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント CHV-90は日本特許2729712号公報に記載の方法で調製した。すなわち、当該公報に記載の操作によってプラスミドpCHV90を構築したうえ、該プラスミドを保有する形質転換体を培養し、該培養物よりCHV-90を調製した。

【0072】

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント CHV-181は、国際公開第97/18318号パンフレットに記載の方法で、CHV-181をコードするDNAを含有するプラスミド (pCHV181) を構築した後、該プラスミドを導入された大腸菌 (Escherichia coli HB101/pCHV181) を培養し、該培養物より、上記のCHV-179と同様の方法で調製した。

【0073】

(2) CHV-92の調製

上記のポリペプチドCHV-181を発現させるためのプラスミド pCHV181について、CHV-181をコードする領域中のIII-13領域をコードする領域を欠失したプラスミドCHV92を構築した。欠失操作は日本特許2729712号公報に記載の、プラスミドpCHV179からのIII-14コード領域の欠失操作に準じて行った。

上記のプラスミドpCHV92で形質転換された大腸菌HB101 (Escherichia coli HB101/pCHV92) を培養し、該培養物より日本特許第2729712号に記載のCHV-89ポリペプチドの精製方法に準じて精製操作を行い、精製CHV-92標品を得た。

【0074】

(3) H-275-Cysの調製

ポリペプチドH-275-Cysを発現させるためのプラスミドは以下に示す操作に従って構築した。Escherichia coli HB101/pCH102 (FERM BP-2800) より

プラスミドpCH102を調製した。このプラスミドを鑄型とし、配列表の配列番号14に塩基配列を示すプライマー12Sと配列表の配列番号15に塩基配列を示すプライマー14Aとを用いたPCRを行い、フィブロネクチンのヘパリン結合ポリペプチドをコードする約0.8kbのDNA断片を得た。得られたDNA断片をNcoI、BamHI（ともに宝酒造社製）で消化した後、NcoI、BamHIで消化したpTV118N（宝酒造社製）とライゲーションすることにより、プラスミドpRH1を構築した。

## 【0075】

プラスミドベクターpINIII-ompA<sub>1</sub>〔グーライエプ J. ら (Ghrayeb J., et al.)、EMBO J.、第3巻、第10号、第2437～2442頁 (1984)〕をBamHIとHincII（宝酒造社製）とで消化し、リポプロテインターミネーター領域を含む約0.9kbのDNA断片を回収した。これをBamHIとHincIIで消化した上記のプラスミドpRH1と混合してライゲーションを行い、lacプロモーター、ヘパリン結合ポリペプチドをコードするDNA断片およびリポプロテインターミネーターをこの順に含むプラスミドpRH1-Tを得た。

## 【0076】

このプラスミドpRH1-Tを鑄型とし、配列表の配列番号16に塩基配列を示すプライマーCys-Aと配列表の配列番号17に塩基配列を示すプライマーCys-Sとを用いたPCR反応の後、回収した増幅DNA断片をNotI（宝酒造社製）で消化し、さらに該DNA断片をセルフライゲーションさせた。こうして得られた環状DNAをSpeIとScaI（宝酒造社製）とで消化して得られる2.3kbのDNA断片と、プラスミドpRH1-TをSpeIとScaI（宝酒造社製）とで消化して得られる2.5kbのDNA断片とを混合してライゲーションを行い、プラスミドpRH-Cysを得た。該プラスミドには、前記のH-271のN末端側にMet-Ala-Ala-Serの4アミノ酸が付加され、さらにC末端にCysが付加されたポリペプチドH-275-Cysがコードされている。

## 【0077】

ポリペプチドH-275-Cysは以下の方法により調製した。上記のプラス

ミド<sub>p</sub>RH-Cysで形質転換された大腸菌HB101 (Escherichia coli HB101/pRH-Cys) を120mlのLB培地中、37℃で1晩培養した。培養液より回収した菌体を40mlの破碎用緩衝液 (50mM Tris-HCl、1mM EDTA、150mM NaCl、1mM DTT、1mM PMSF、pH 7.5) に懸濁し、超音波処理を行って菌体を破碎した。遠心分離を行って得られた上清を精製用緩衝液 (50mM Tris-HCl、pH 7.5) で平衡化されたハイトラップ-ヘパリンカラム（ファルマシア社製）にかけた。同緩衝液でカラム内の非吸着画分を洗浄した後、0～1M NaCl濃度勾配を持つ精製用緩衝液で溶出を行った。溶出液をSDS-ポリアクリラミドゲル電気泳動で分析し、H-275-Cysの分子量に相当する画分を集めて精製H-275-Cys標品を得た。

## 【0078】

## 実施例2 CTLにおけるCD8陽性細胞比率

## (1) PBMCの分離および保存

インフォームド・コンセントの得られたHLA-A2.1保有ヒト健常人ドナーより成分採血を実施後、採血液をPBS(-)で2倍希釈し、Ficoll-paque（ファルマシア社製）上に重層して500gで20分間遠心分離した。中間層の末梢血単核細胞(PBMC)をピペットで回収、洗浄した。採取したPBMCは90% FBS (Bio Whittaker社製) / 10%DMSO (SIGMA社製) からなる保存液に懸濁し、液体窒素中にて保存した。CTL誘導時にはこれら保存PBMCを37℃水浴中にて急速融解し、10μg/ml DNase (Calbiochem社製) を含むRPMI1640培地 (Bio Whittaker社製) で洗浄後、トリパンブルー染色法にて生細胞数を算出して各実験に供した。

## 【0079】

## (2) 抗インフルエンザウイルスメモリーCTLの誘導

抗インフルエンザウイルスメモリーCTLの誘導は、Bednarekらの方法 [J. Immunology, 第147巻、第12号、第4047～4053頁 (1991)] を一部改変して実施した。すなわち、5%ヒトAB型血清、0.1mM非必須アミノ酸、1mM ピルビン酸ナトリウム、2mM L-グルタミン（全てBio Whittaker社製）、10mM HEPES(ナカライトスク社製)、1%ストレプトマイシン-ペニシリン（ギブコBRL社製）を含むRPM

I1640培地 (Bio Whittaker社製) (以下5HRPMIと略す) に $1\sim4\times10^6$ cells/mlとなるように実施例2-(1)で調製したPBMCを懸濁後、24穴細胞培養プレート (Falcon社製) に1ml/ウェルずつまき、5%CO<sub>2</sub>温式インキュベーター中、37℃で1.5時間インキュベートし、プラスチック接着性の単球を分離した。その後、非接着性の細胞をRPMI1640培地を用いて回収し、レスポンダー細胞として氷上に保存した。分離した単球には、抗原ペプチドとして5μg/mlのインフルエンザウイルスタンパク質由来エピトープペプチド (配列表の配列番号18に記載のマトリックスプロテイン由来A2.1結合性ペプチド) および1μg/mlのβ2マイクログロブリン (スクリプス社製) を含む5HRPMIを0.5mlづつ添加し、2時間室温にてインキュベート後、X線照射 (5500R) して抗原提示細胞とした。各ウェルからペプチド液を吸引除去し、ウェルをRPMI1640培地を用いて洗浄後、氷上保存しておいたレスポンダー細胞を $0.5\sim2\times10^6$ cells/mlとなるよう5HRPMIに懸濁し、1ml/ウェルづつ抗原提示細胞上に添加した。このとき、実施例1に記載の各フィブロネクチンフラグメント (以下、FNfrと記載する) を終濃度10μg/mlとなるように添加した。対照として、FNfrを添加しない群も設定した。プレートを5%CO<sub>2</sub>中、37℃で培養した。培養開始後2日目に、60U/mlのIL-2 (塩野義製薬社製) と10μg/mlのFNfrを含む1mlの5HRPMI (対照は、IL-2のみ含有) を各ウェルに添加、また5日目には培養上清を半分除去後同様のIL-2およびFNfr含有培地 (対照はIL-2のみ含有) を1mlずつ添加した。7日目に上記と同様にして抗原提示細胞を調製したあと、1週間培養したレスポンダー細胞を $0.5\sim2\times10^6$ cells/mlとなるよう5HRPMIに懸濁、調製した抗原提示細胞上に1ml/ウェルずつ添加し、再刺激した。このとき、FNfrを終濃度10μg/mlとなるように添加した (対照は無添加)。再刺激後2日目に、60U/mlのIL-2および10μg/mlのFNfrを含む (対照はIL-2のみ含有) 1mlの5HRPMIを各ウェルに添加した。また5日目には培養上清を半分除去後、除去前と同じ内容の培地を1mlづつ添加し、さらに培養を2日続け、CTLを誘導した。

## 【0080】

## (3) CTL細胞傷害活性の測定

実施例2-(2)で調製した誘導開始後14日目のCTLの細胞傷害活性は、Ca

Calcein-AMを用いた細胞傷害活性測定法〔リヒテンフェルズ R. ら (Lichtenfels R., et al.)、J. Immunol. Methods、第172巻、第2号、第227～239頁(1994)〕にて評価した。一晩エピトープペプチドと共に培養、もしくはエピトープペプチド非存在下で培養したHLA-A2.1保持EBVトランスフォームB細胞（細胞名 221A2.1）を $1 \times 10^6$ cells/mlとなるよう5%FBS (Bio Whittaker社製) を含むRPMI1640培地に懸濁後、終濃度25 μMとなるようにCalcein-AM（ドータイト社製）を添加し、37°Cで1時間培養した。細胞をCalcein-AMを含まない培地にて洗浄後20倍量のK562細胞 (ATCC CCL-243) と混合し、Calcein標識標的細胞とした。なお、K562細胞はレスポンダー細胞中に混入するNK細胞による非特異的傷害活性を排除するために用いた。

実施例2-(2)で調製したメモリーCTLをエフェクター細胞として $1 \times 10^5$ ～ $9 \times 10^6$ cells/mlとなるように5HRPMIで段階希釈後、96穴細胞培養プレートの各ウェルに100 μl／ウェルずつ分注しておき、これらに $1 \times 10^5$ /mlに調製したCalcein標識標的細胞を100 μl／ウェルずつ添加した。上記細胞懸濁液の入ったプレートを400gで1分間遠心後、37°Cの温式CO<sub>2</sub>インキュベーター内で4時間インキュベートした。4時間後、各ウェルから培養上清100 μlを採取し、蛍光プレートリーダー (485nm/538nm) によって培養上清中に放出されたcalcein量を測定した。特異的細胞傷害活性は以下の式1にしたがって算出した。

式1：特異的細胞傷害活性 (%) = [(各ウェルの測定値 - 最小放出量) / 最大放出量 - 最小放出量] × 100

#### 【0081】

上式において最小放出量は標的細胞およびK562細胞のみ含有するウェルのcalcein放出量であり、標的細胞からのcalcein自然放出量を示す。また、最大放出量は標的細胞に界面活性剤であるTriton X-100 (ナカライトスク社製) を0.1%加えて細胞を完全破壊した際のcalcein放出量を示している。この結果、誘導直後において、特異的細胞傷害活性は誘導されていたが、誘導時のFNfr添加の有無による細胞傷害活性の差はほとんどなかった。

#### 【0082】

#### (4) CTL細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率の測定

実施例2-(2)で調製した $2 \times 10^5$ cellsのCTLを1%パラホルムアルデヒド(ナカライトスク社製)を含むPBS(ニッスイ社製)を用いて固定した後、PBSで洗浄した。固定細胞を1%BSA(SIGMA社製)を含む100μlのPBS中に懸濁し、FITC標識マウスIgG1もしくはFITC標識マウス抗ヒトCD8抗体(ともにDAKO社製)を添加後、氷上で30分インキュベートした。インキュベート後、細胞をPBSで洗浄し、再度1%パラホルムアルデヒドを含むPBSに懸濁した。この細胞をFACS Vantage(ベクトン・ディッキンソン社製)を用いたフローサイトメトリーに供し、CD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表1に示す。

## 【0083】

【表1】

表1

フィブロネクチンフラグメント	CD8陽性細胞含有率(%)
対照(FNfr 無添加)	60.2
CH-296	88.8
CH-271	65.7
H-271	81.4
C-274	86.2
H-275-Cys	79.0
CHV-89	70.2
CHV-90	77.0
CHV-181	73.1
対照(FNfr 無添加)	33.0
H-296	40.1
C-CS1	41.6
CHV-92	44.0
CHV-179	37.8

## 【0084】

表1に示されるように、CTL誘導時にフィブロネクチンフラグメント（CH-296、CH-271、H-296、H-271、C-274、C-CS1、H-275-Cys、CHV-89、CHV-90、CHV-92、CHV-179、CHV-181）を添加した群においては、これらを添加しない対照に比較して、CTL誘導開始後14日目におけるCD8陽性細胞の比率が高い。すなわち、フィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、CD8陽性細胞を優位に増殖させながらCTLを誘導することが可能であることが明らかとなった。

## 【0085】

## 実施例3 インターロイキン-2レセプター発現の誘導

## (1) 抗インフルエンザウイルスメモリーCTLの誘導

実施例2-(1)に記載の方法で分離、保存したPBMCを用い、実施例2-(2)と同様の方法で抗インフルエンザウイルスメモリーCTLの誘導を行った。誘導開始後14日目のCTLの細胞傷害活性を、実施例2-(3)に記載の方法で評価したところ、誘導時のFNfr添加の有無による細胞傷害活性の差はほとんどなかった。

## 【0086】

## (2) CTLにおけるインターロイキン-2レセプター発現率の測定

実施例3-(1)で調製した誘導開始後14日目のCTLにおけるインターロイキン-2レセプター(IL-2R)発現率の測定は、実施例2-(4)に記載の方法に準じて行った。なお、今回の操作ではFITC標識マウス抗ヒトCD8抗体をFITC標識マウス抗ヒトIL-2R(CD25)抗体(DAKO社製)に変更した。結果を表2に示す。

## 【0087】

【表2】

表2

フィブロネクチンフラグメント	I L - 2 R 発現陽性細胞含有率 (%)
対照 (FNfr 無添加)	29.8
CH-296	65.9
H-296	59.4
H-271	54.6
C-274	61.5
H-275-Cys	78.2
CHV-89	82.3
CHV-90	48.3
CHV-92	55.6
CHV-179	50.3
CHV-181	44.8
対照 (FNfr 無添加)	46.9
CH-271	60.9
C-CS1	72.3

## 【0088】

表2に示されるように、各種のフィブロネクチンフラグメントを添加して誘導されたCTLにおいてはいずれも細胞集団中のIL-2R発現率の上昇が見られた。すなわち、フィブロネクチンフラグメントの共存下に誘導を行うことにより、IL-2R発現量を増加させながらCTLを誘導することが可能であることが明らかとなった。

## 【0089】

## 実施例4 CTLの拡大培養

## (1) 抗インフルエンザウイルスメモリーCTLの誘導

実施例2-(1)に記載の方法で分離、保存したPBMCを用い、実施例2-(2)

)と同様の方法で抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導を行った。誘導開始後14日目のCTLの細胞傷害活性を、実施例2-(3)に記載の方法で評価したところ、誘導時のFNfr添加の有無による細胞傷害活性の差はほとんどなかった。

## 【0090】

## (2) CTLの拡大培養

実施例4-(1)で調製したCTLを5HRPMIで洗浄後、 $3 \times 10^4$ cells/mlに調製した。一方、実施例2-(1)と同様の方法により採取したHLA-A2.1非保持allogenic PBMCをX線照射(3300R)し、培地で洗浄後2~5 $\times 10^6$ cells/mlに調製した。これらのCTL( $3 \times 10^4$ cells)とallogenic PBMC(4~10 $\times 10^6$ cells)を10mlの5HRPMIもしくは10%HycloneFBS、0.1mM非必須アミノ酸、1mMピルビン酸ナトリウム、2mM L-グルタミン(全てBio Whittaker社製)、10mM HEPES(ナカライテスク社製)、1%ストレプトマイシン-ペニシリン(ギブコBRL社製)を含むRPMI1640培地(Bio Whittaker社製)(以下、10HycloneRPMIと略す)に懸濁し、さらに終濃度50ng/mlの抗CD3抗体(ヤンセン協和社製)を加えて12.5cm<sup>2</sup>のフラスコ(ファルコン社製)に入れ、37℃湿式CO<sub>2</sub>インキュベーター中で14日間培養した。この際、CTL誘導の際に添加したものと同じ終濃度10μg/mlのFNfrを添加した。また、FNfrを添加せずに誘導を行った対照群にはFNfrは添加しなかった。この間ペプチドによる刺激はまったく付加せず、培養開始1日に終濃度120U/mlのIL-2を添加、さらに培養開始後4日目以降は2~3日ごとに培養上清を半分除去後、60U/mlのIL-2を含む5HRPMIもしくは10HycloneRPMI5mlを各フラスコに添加した。この際、FNfr添加群の培地には同濃度のFNfrを添加した。拡大培養開始後、14日目に実施例2-(3)と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定し、拡大培養前の特異的細胞傷害活性をどれだけ維持しているかを「特異的細胞傷害活性維持(%)」として算出した。

「特異的細胞傷害活性維持(%)」は以下の式2にしたがって算出した。

式2：特異的細胞傷害活性維持(%) = [拡大培養後の特異的細胞傷害活性(%) / 拡大培養前の特異的細胞傷害活性(%)] × 100

測定結果は表3に示した。なお、表中においてE/T ratioは標的細胞に対する

エフェクター細胞の比を示す。

## 【0091】

【表3】

表3

培地	フィブロネクチン フラグメント	拡大増殖率（倍）	細胞傷害活性維持（%）
			E/T ratio = 3
5HRPMI	対照 (FNfr 無添加)	417	17.3
	CH-271	397	53.5
	H-296	413	49.3
	C-CS1	393	49.3
	CHV-92	370	66.2
10HycloneRPMI	対照 (FNfr 無添加)	130	48.1
	CH-271	132	250.8
	H-296	75	162.3
	H-271	52	72.2
	C-CS1	130	100.2
	CHV-92	35	157.8

培地	フィブロネクチン フラグメント	拡大増殖率（倍）	細胞傷害活性維持（%）
			E/T ratio = 10
10HycloneRPMI	対照 (FNfr 無添加)	42	46.3
	CHV-89	35	69.0
	CHV-90	36	75.6

## 【0092】

表3に示されるように、誘導時ならびに拡大培養時に各種のフィブロネクチンフラグメントを添加した群のCTLは、フィブロネクチンフラグメントを添加しなかった対照に比べて、14日間の拡大培養の後も特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。つまり、フィブロネクチンフラグメントの共存下に誘導、拡大培

養を行うことにより、高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態でのCTLの拡大培養が可能であることが明らかになった。

## 【0093】

## 実施例5 CTL拡大培養後細胞集団におけるIL-2Rの発現

## (1) 抗インフルエンザウイルスメモリーCTLの誘導

実施例2-(1)に記載の方法で分離、保存したPBMCを用い、実施例2-(2)と同様の方法で抗インフルエンザウイルスメモリーCTLの誘導を行った。誘導開始後14日目のCTLの細胞傷害活性を、実施例2-(3)に記載の方法で評価したところ、誘導時のFNfr添加の有無による細胞傷害活性の差はほとんどなかった。

## 【0094】

## (2) 拡大培養されたCTLにおけるインターロイキン-2レセプター発現率の測定

実施例5-(1)で調製したCTLを実施例4-(2)と同様の方法で拡大培養した。こうして得られた、拡大培養後のCTLについて、実施例3-(2)に記載の方法でIL-2R発現陽性細胞の比率を測定した。結果を表4に示す。

## 【0095】

## 【表4】

表4

フィブロネクチンフラグメント	I L - 2 R 発現陽性細胞含有率 (%)
対照 (FNfr 無添加)	19. 5
CH-271	45. 3
H-296	47. 7
H-271	48. 3
C-274	53. 5
H-CS	39. 7
CHV-891	28. 6
CHV-90	60. 0
CHV-179	53. 7
CHV-181	50. 3

## 【0096】

表4に示されるように、C T L誘導時および拡大培養時に各種のフィブロネクチンフラグメントを添加した群においては、いずれも拡大培養後の細胞集団上におけるI L - 2 R発現細胞の比率の上昇が認められた。

つまり、フィブロネクチンフラグメントの存在下にC T L誘導し、拡大培養を行うことにより、I L - 2 Rの発現量を増加させながら、C T Lを拡大培養することが可能であることが明らかになった。

## 【0097】

## 実施例6 フィブロネクチン存在下でのC T L誘導、拡大培養

## (1) 抗インフルエンザウイルス メモリーC T Lの誘導

実施例2-(1)に記載の方法で分離、保存したPBMCを用い、実施例2-(2)と同様の方法で抗インフルエンザウイルス メモリーC T Lの誘導を行った。このとき、FNfrにかえてフィブロネクチン(カルビオケム社製)を終濃度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加した(対照は無添加)。誘導開始後14日目のC T Lの細胞傷害活性を、実施例2-(3)に記載の方法で評価したところ、誘導時のFNfr添

加の有無による細胞傷害活性の差はほとんどなかった。

## 【0098】

## (2) CTLにおけるインターロイキン-2レセプター発現率の測定

実施例6-(1)で調製したCTLについて、実施例3-(2)に記載の方法でIL-2R発現陽性細胞の比率を測定した。結果を表5に示す。

## 【0099】

【表5】

IL-2R発現陽性細胞含有率 (%)	
対照(フィブロネクチン無添加)	34.0
フィブロネクチン	64.6

## 【0100】

表5に示されるように、フィブロネクチン存在下に誘導されたCTLでは、細胞集団上におけるIL-2Rの発現量の上昇が見られた。

つまり、フィブロネクチン存在下にCTLの誘導を行うことにより、IL-2Rの発現量を増加させながらCTLを誘導することが可能であることが明らかになった。

## 【0101】

## (3) CTLの拡大培養

実施例6-(1)で調製したCTLを実施例4-(2)と同様の方法で拡大培養した。このとき、誘導時にフィブロネクチンが添加されていたものにはフィブロネクチン(カルビオケム社製)を終濃度10μg/mlとなるように添加した(対照は無添加)。得られたCTLの細胞傷害活性を実施例2-(3)と同様の方法にて測定し、拡大培養前の特異的細胞傷害活性をどれだけ維持しているかを「特異的細胞傷害活性維持(%)」として算出した。

測定結果は表6に示した。

## 【0102】

【表6】

表6

	拡大増殖率（倍）	細胞傷害活性維持（%）
	E/T ratio = 3	
対照（フィブロネクチン無添加）	130	48.1
フィブロネクチン	157	148.9

## 【0103】

表6に示されるように、フィブロネクチンの存在下にCTL誘導および拡大培養を行った群においては高い細胞傷害活性が保持されていた。一方、CTL誘導時および拡大培養時のどちらにもフィブロネクチンを添加しなかった対照の細胞傷害活性は明らかに低下していた。つまり、フィブロネクチンをCTL誘導時および拡大培養時に添加することにより、特異的に細胞傷害活性を長期的に保持した状態でのCTLの拡大培養が可能であることが明らかになった。

## 【0104】

実施例7 固定化されたフィブロネクチンフラグメント存在下でのCTL拡大培養

## (1) FNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養用器材（容器）にフィブロネクチンフラグメントを固定化した。すなわち、24穴細胞培養プレート、 $12.5\text{cm}^2$  フラスコに各種フィブロネクチンフラグメント（終濃度 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を含むPBSを $1\sim2\text{ml}$ ずつ添加し、室温で2時間インキュベートした後、使用時まで $4^\circ\text{C}$ で保存した。また上記のプレート、フラスコは使用前にPBSで2回洗浄した。

## 【0105】

## (2) 抗インフルエンザウイルスメモリーCTLの誘導

実施例2-(1)に記載の方法で分離、保存したPBMCを用い、実施例2-(2)と同様の方法で、抗インフルエンザウイルスメモリーCTLの誘導を行った。このとき、培養器材としてFNfrを固定化したプレートを使用した（対照には固定化処理を行っていないプレートを使用）。誘導後のCTLの細胞傷害活性を、

実施例2-(3)に記載の方法で評価したところ、誘導時に使用したプレートのFNfr固定化の有無による細胞傷害活性の差はほとんどなかった。

## 【0106】

## (3) CTLの拡大培養

実施例7-(2)で調製したCTLを実施例2-(3)と同様の方法で拡大培養した。この際、培養器材として各種FNfrを固定化したフラスコを使用した(対照には固定化処理を行っていないフラスコを使用)。また、培地には10HycloneR PMIを用いた。

こうして拡大培養されたCTLの細胞傷害活性が拡大培養前に比較してどれだけ維持されているかを「特異的細胞傷害活性維持(%)」として表し評価した。

測定結果は表7に示した。

## 【0107】

## 【表7】

表7

フィブロネクチン フラグメント	拡大増殖率(倍)	細胞傷害活性維持(%)
		E/T ratio = 3
対照(FNfr非固定)	130	48.1
CH-271	128	95.4
H-296	27	95.0
H-271	40	133.9
C-CS1	130	73.8
H-275-Cys	87	137.7
CHV-92	122	92.7

## 【0108】

表7に示されるように、CTL誘導時および拡大培養時にフィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材(プレート、フラスコ)を使用した群のCTLは拡大培養後にも特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。一方、CTL誘導時および拡大培養時のどちらにもフィブロネクチンフラグメントを固定化しない

器材を使用した対照では、細胞傷害活性は明らかに低下していた。つまり、固定化されたフィブロネクチンフラグメントを使用することにより、培地中に溶解しているフラグメントと同様に高い細胞傷害活性を長期的に保持したCTLを拡大培養することが可能であることが明らかになった。

## 【0109】

## 配列表フリー テキスト

SEQ ID NO:4 ; Fibronectin fragment named H-296.  
 SEQ ID NO:5 ; Fibronectin fragment named CH-271.  
 SEQ ID NO:6 ; Fibronectin fragment named CH-296.  
 SEQ ID NO:7 ; Fibronectin fragment named C-CS1.  
 SEQ ID NO:8 ; Fibronectin fragment named CHV-89.  
 SEQ ID NO:9 ; Fibronectin fragment named CHV-90.  
 SEQ ID NO:10 ; Fibronectin fragment named CHV-92.  
 SEQ ID NO:11 ; Fibronectin fragment named CHV-179.  
 SEQ ID NO:12 ; Fibronectin fragment named CHV-181.  
 SEQ ID NO:13 ; Fibronectin fragment named H-275-Cys.  
 SEQ ID NO:14 ; Primer 12S.  
 SEQ ID NO:15 ; Primer 14A.  
 SEQ ID NO:16 ; Primer Cys-A.  
 SEQ ID NO:17 ; Primer Cys-S.  
 SEQ ID NO:18 ; Designed peptide based on matrixprotein derived from influenza virus.

## 【0110】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Takara Shuzo Co., Ltd.

<120> Process for the preparation of T cell having cytotoxic activity

&lt;130&gt; T-1740

&lt;160&gt; 18

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 274

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 1

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu

20 25 30

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu

35 40 45

Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu

50 55 60

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln

65 70 75

His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp

80 85 90

Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe

95 100 105

Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg

110 115 120

Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp

125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr		
140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg		
155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp		
170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp		

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 2

Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His

1	5	10	15
Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr			
	20	25	

<210> 3

<211> 271

<212> PRT

<213> Human

<400> 3

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro			
1	5	10	15
Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr			
	20	25	30
Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met			
	35	40	45
Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser			
	50	55	60
Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu			
	65	70	75
Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr			
	80	85	90
Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala			
	95	100	105
Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr			
	110	115	120
Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr			
	125	130	135

Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile		
140	145	150
Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr		
155	160	165
Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser		
170	175	180
Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr		
185	190	195
Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile		
200	205	210
Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg		
215	220	225
Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile		
230	235	240
Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala		
245	250	255
Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys		
260	265	270

Thr

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 296

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; fibronectin fragment named H-296

&lt;400&gt; 4

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro  
 1 5 10 15  
 Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr  
 20 25 30  
 Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met  
 35 40 45  
 Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser  
 50 55 60  
 Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu  
 65 70 75  
 Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr  
 80 85 90  
 Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala  
 95 100 105  
 Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr  
 110 115 120  
 Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr  
 125 130 135  
 Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile  
 140 145 150  
 Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr  
 155 160 165  
 Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser  
 170 175 180  
 Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr  
 185 190 195  
 Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile  
 200 205 210

Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg  
 215 220 225  
 Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile  
 230 235 240  
 Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala  
 245 250 255  
 Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys  
 260 265 270  
 Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu  
 275 280 285  
 His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr  
 290 295

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 549

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; fibronectin fragment named CH-271

&lt;400&gt; 5

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg  
 1 5 10 15  
 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu  
 20 25 30  
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu  
 35 40 45

Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu  
                   50                     55                     60  
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln  
                   65                     70                     75  
 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp  
                   80                     85                     90  
 Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe  
                   95                     100                    105  
 Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg  
                   110                    115                    120  
 Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp  
                   125                    130                    135  
 Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr  
                   140                    145                    150  
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg  
                   155                    160                    165  
 Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp  
                   170                    175                    180  
 Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu  
                   185                    190                    195  
 Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg  
                   200                    205                    210  
 Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe  
                   215                    220                    225  
 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys  
                   230                    235                    240  
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg  
                   245                    250                    255  
 Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg

260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp		
275	280	285
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp		
290	295	300
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr		
305	310	315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro		
320	325	330
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys		
335	340	345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg		
350	355	360
Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro		
365	370	375
Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile		
380	385	390
Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp		
395	400	405
Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys		
410	415	420
Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr		
425	430	435
Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser		
440	445	450
Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser		
455	460	465
Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser		
470	475	480

Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr  
                   485                  490                  495  
 Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg  
                   500                  505                  510  
 Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr  
                   515                  520                  525  
 Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser  
                   530                  535                  540  
 Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr  
                   545

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 574

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; fibronectin fragment named CH-296

&lt;400&gt; 6

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg  
     1              5                  10                  15  
 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu  
     20             25                  30  
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu  
     35             40                  45  
 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu  
     50             55                  60

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln  
 65 70 75  
 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp  
 80 85 90  
 Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe  
 95 100 105  
 Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg  
 110 115 120  
 Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp  
 125 130 135  
 Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr  
 140 145 150  
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg  
 155 160 165  
 Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp  
 170 175 180  
 Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu  
 185 190 195  
 Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg  
 200 205 210  
 Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe  
 215 220 225  
 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys  
 230 235 240  
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg  
 245 250 255  
 Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg  
 260 265 270  
 Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp

275	280	285
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp		
290	295	300
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr		
305	310	315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro		
320	325	330
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys		
335	340	345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg		
350	355	360
Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro		
365	370	375
Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile		
380	385	390
Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp		
395	400	405
Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys		
410	415	420
Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr		
425	430	435
Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser		
440	445	450
Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser		
455	460	465
Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser		
470	475	480
Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr		
485	490	495

Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg  
 500 505 510  
 Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr  
 515 520 525  
 Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser  
 530 535 540  
 Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu  
 545 550 555  
 Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp  
 560 565 570  
 Val Pro Ser Thr

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 302

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; fibronectin fragment named C-CS1

&lt;400&gt; 7

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg  
 1 5 10 15  
 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu  
 20 25 30  
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu  
 35 40 45  
 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu

50	55	60												
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
65														75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
80														90
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
95														105
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
110														120
Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
125														135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
140														150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
155														165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
170														180
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
185														195
Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
200														210
Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
215														225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys
230														240
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
245														255
Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	Ile	Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg
260														270

<210> 8

<211> 367

<212> PRT

### <213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-89

<400> 8

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1														15
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
														30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
														45
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
														60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
														75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
														90
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe

95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg		
110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp		
125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr		
140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg		
155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp		
170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg		
275	280	285
Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp		
290	295	300
Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val		
305	310	315

Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp  
                   320                  325                  330  
 Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr  
                   335                  340                  345  
 Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro  
                   350                  355                  360  
 Val Val Ile Asp Ala Ser Thr  
                   365

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 368

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; fibronectin fragment named CHV-90

&lt;400&gt; 9

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg  
   1              5                  10                  15  
 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu  
   20              25                  30  
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu  
   35              40                  45  
 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu  
   50              55                  60  
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln  
   65              70                  75

His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp  
 80 85 90  
 Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe  
 95 100 105  
 Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg  
 110 115 120  
 Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp  
 125 130 135  
 Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr  
 140 145 150  
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg  
 155 160 165  
 Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp  
 170 175 180  
 Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu  
 185 190 195  
 Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg  
 200 205 210  
 Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe  
 215 220 225  
 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys  
 230 235 240  
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg  
 245 250 255  
 Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg  
 260 265 270  
 Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn  
 275 280 285  
 Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp

290	295	300
Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu		
305	310	315
Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro		
320	325	330
Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu		
335	340	345
Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu		
350	355	360
Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr		
365		

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 370

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; fibronectin fragment named CHV-92

&lt;400&gt; 10

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg		
1	5	10
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu		
20	25	30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu		
35	40	45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu		

50	55	60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln		
65	70	75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp		
80	85	90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe		
95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg		
110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp		
125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr		
140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg		
155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp		
170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270

Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp		
275	280	285
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp		
290	295	300
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr		
305	310	315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro		
320	325	330
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys		
335	340	345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg		
350	355	360
Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu		
365	370	

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 457

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; fibronectin fragment named CHV-179

&lt;400&gt; 11

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg			
1	5	10	15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu			
20	25	30	

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu  
                  35                        40                        45  
 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu  
                  50                        55                        60  
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln  
                  65                        70                        75  
 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp  
                  80                        85                        90  
 Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe  
                  95                        100                       105  
 Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg  
                  110                       115                       120  
 Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp  
                  125                       130                       135  
 Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr  
                  140                       145                       150  
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg  
                  155                       160                       165  
 Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp  
                  170                       175                       180  
 Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu  
                  185                       190                       195  
 Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg  
                  200                       205                       210  
 Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe  
                  215                       220                       225  
 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys  
                  230                       235                       240  
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg

245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg		
275	280	285
Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp		
290	295	300
Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val		
305	310	315
Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp		
320	325	330
Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr		
335	340	345
Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro		
350	355	360
Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu		
365	370	375
Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln		
380	385	390
Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys		
395	400	405
Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly		
410	415	420
Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr		
425	430	435
Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro		
440	445	450
Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr		
455		

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 472

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; fibronectin fragment named CHV-181

&lt;400&gt; 12

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu

20 25 30

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu

35 40 45

Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu

50 55 60

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln

65 70 75

His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp

80 85 90

Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe

95 100 105

Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg

110 115 120

Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp

125 130 135

Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr  
 140 145 150  
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg  
 155 160 165  
 Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp  
 170 175 180  
 Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu  
 185 190 195  
 Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg  
 200 205 210  
 Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe  
 215 220 225  
 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys  
 230 235 240  
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg  
 245 250 255  
 Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg  
 260 265 270  
 Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp  
 275 280 285  
 Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp  
 290 295 300  
 Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr  
 305 310 315  
 Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro  
 320 325 330  
 Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys  
 335 340 345  
 Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg

350	355	360
Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro		
365	370	375
Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile		
380	385	390
Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp		
395	400	405
Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys		
410	415	420
Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr		
425	430	435
Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser		
440	445	450
Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser		
455	460	465
Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr		
470		

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 275

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; fibronectin fragment named H-275-Cys

&lt;400&gt; 13

Met Ala Ala Ser Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr

1	5	10	15
Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn			
20	25	30	
Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys			
35	40	45	
Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser			
50	55	60	
Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser			
65	70	75	
Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly			
80	85	90	
Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg			
95	100	105	
Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr			
110	115	120	
Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala			
125	130	135	
Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg			
140	145	150	
Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile			
155	160	165	
Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val			
170	175	180	
Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe			
185	190	195	
Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro			
200	205	210	
Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly			
215	220	225	

Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr  
 230 235 240  
 Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile  
 245 250 255  
 Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile  
 260 265 270  
 Gly Arg Lys Lys Thr Cys  
 275

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer 12S

&lt;400&gt; 14

aaaccatggc agcttagcgct attcctgcac caactgac 38

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer 14A

<400> 15

aaaggatccc taactagtct tttccttcc aatcag 36

<210> 16

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer Cys-A

<400> 16

aaaagcggcc gctagcgcaa gccatggtct gttcctgtg 40

<210> 17

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer Cys-S

<400> 17

aaaagcggcc gcactagtgc atagggatcc ggctgagtgagcaa c 41

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed peptide based on matrixprotein derived from influenza vir  
us

<400> 18

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu

1

5

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

養子免疫療法等への使用に適した、細胞傷害活性を高いレベルで保持したT細胞を調製する方法を提供する。

【解決手段】

フィブロネクチン、そのフラグメント又はそれらの混合物から選択される物質の存在下にT細胞の細胞傷害活性を誘導し、また、当該細胞を維持、拡大培養することにより、インターロイキン-2 レセプターを高発現する細胞および／またはCD8陽性細胞を高比率で含有する細胞を得ることができ、また、細胞の有する細胞傷害活性を高く維持することができる。前記物質を有効成分として使用し、高い細胞傷害活性を保持したT細胞を調製することにより、上記課題を解決する。

【選択図】 なし

職権訂正履歴（書類修正）

特許出願の番号	特願2002-084414
受付番号	50200418201
書類名	特許願
担当官	大竹 仁美 4128
作成日	平成15年 1月23日

＜修正内容＞

明細書の段落番号【0110】に【配列表】を加えます。

次頁無

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2002- 84414

【承継人】

【識別番号】 302019245

【氏名又は名称】 タカラバイオ株式会社

【代表者】 加藤 郁之進

【提出物件の目録】

【物件名】 権利の承継を証する登記簿謄本 1

【援用の表示】 平成3年特許願第65261号の出願人名義変更届に添付のものを援用する。

【物件名】 権利の承継を証する承継証明書 1

【援用の表示】 平成3年特許願第65261号の出願人名義変更届に添付のものを援用する。

【プルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-084414
受付番号	50200701657
書類名	出願人名義変更届（一般承継）
担当官	田丸 三喜男 9079
作成日	平成14年 6月27日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年 5月16日

次頁無

出願人履歴情報

識別番号 [591038141]

1. 変更年月日 1991年 2月 4日

[変更理由] 新規登録

住 所 京都府京都市伏見区竹中町609番地

氏 名 寶酒造株式会社

2. 変更年月日 2002年 4月 1日

[変更理由] 名称変更

住 所 京都府京都市下京区四条通烏丸東入長刀鉾町20番地

氏 名 宝ホールディングス株式会社

出願人履歴情報

識別番号 [302019245]

1. 変更年月日 2002年 4月 1日

[変更理由] 新規登録

住 所 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号  
氏 名 タカラバイオ株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**